

<b>MENU</b>	<b>SEARCH</b>	<b>INDEX</b>	<b>DETAIL</b>	<b>JAPANESE</b>	<b>LEGAL STATUS</b>
-------------	---------------	--------------	---------------	-----------------	---------------------

1 / 1

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-178574

(43)Date of publication of application : 06.07.1999

(51)Int.Cl. C12N 15/09  
 C07K 14/32  
 C07K 14/47  
 C12N 1/21  
 // C12P 21/02  
 (C12N 1/21  
 C12R 1:08 )  
 (C12P 21/02  
 C12R 1:08 )

(21)Application number : 09-353216

(71)Applicant : TOYOTA CENTRAL RES & DEV  
 LAB INC  
 HIGETA SHOYU CO LTD

(22)Date of filing : 22.12.1997

(72)Inventor : KAJINO TSUTOMU  
 TAKAHASHI HARUO  
 YAMADA YUKIO  
 HIRAI MASAKATA  
 TAKAGI HIROAKI  
 EBISU SHIYOUGO  
 WATANABE FUMIKO

### (54) NEW COLLAGENLIKE PROTEIN

#### (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a new recombinant DNA useful for the production, etc., of a soluble collagenlike protein by joining the 3'-terminal of a DNA containing a promoter region derived from *Bacillus brevis* to a DNA encoding the collagenlike protein joined in a tandem form.

**SOLUTION:** This new recombinant DNA is obtained by joining the 3'-terminal of a DNA containing a promoter region derived from *Bacillus brevis* to a DNA encoding a new collagenlike protein joined in a tandem form and is capable of producing the new soluble collagenlike protein by culturing the *Bacillus brevis* containing the recombinant DNA integrated therinto. The recombinant DNA is obtained by designing a monomer unit of a hydrophilic gelatin capable of manifesting the maximum hydrophilicity of a human I type collagen based on a partial amino acid sequence of the human I type collagen, synthesizing the DNA and joining the synthesized DNA to the 3'-terminal of the DNA containing the promoter region derived from the *Bacillus brevis* in a tandem form.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-178574

(43) 公開日 平成11年(1999) 7月6日

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>  
C 1 2 N 15/00  
C 0 7 K 14/32  
14/47  
C 1 2 N 1/21  
// C 1 2 P 21/02

識別記号  
Z N A

F 1  
C 1 2 N 15/00 Z N A A  
C 0 7 K 14/32  
14/47  
C 1 2 N 1/21  
C 1 2 P 21/02

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-353216

(22) 出願日 平成9年(1997)12月22日

(71) 出願人 000003609  
株式会社豊田中央研究所  
愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番  
地の1

(71) 出願人 000112060  
ヒゲタ醤油株式会社  
東京都中央区日本橋小網町2番3号

(72) 発明者 堀野 勉  
愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番  
地の1 株式会社豊田中央研究所内

(74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規コラーゲン様タンパク質

(57) 【要約】

【課題】 新規コラーゲン様タンパク質（ペプチド）及  
びその製造方法の提供。

【解決手段】 新規コラーゲン様タンパク質。該タンパ  
ク質のアミノ酸配列をコードする遺伝子を組み込んだバ  
チルス・プレビスを培養することによる該タンパク質を  
製造する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 バチルス・ブレイビス (*Bacillus brevis*) 由来のプロモーター領域を含むDN Aの3'末端にタンデムに連結したタンパク質(ペプチド)をコードするDNAを連結した組換えDNA。

【請求項2】 配列表の配列番号1のアミノ酸配列が1～30個連結された新規コラーゲン様タンパク質。

【請求項3】 配列番号2のアミノ酸配列が1～30個連結された請求項2に記載の新規コラーゲン様タンパク質。

【請求項4】 配列番号3のアミノ酸配列で示される請求項2又は3に記載の新規コラーゲン様タンパク質。

【請求項5】 配列番号4のアミノ酸配列が1～30個連結された請求項2に記載の新規コラーゲン様タンパク質。

【請求項6】 配列番号5のアミノ酸配列で示される請求項2又は5に記載の新規コラーゲン様タンパク質。

【請求項7】 請求項2～6のいずれか1項に記載の新規コラーゲン様タンパク質のアミノ酸配列をコードする遺伝子。

【請求項8】 配列番号6又は配列番号7の塩基配列で示される請求項7に記載の遺伝子。

【請求項9】 請求項2～6のうちのいずれかに記載のアミノ酸配列をコードする遺伝子あるいは請求項7又は8の遺伝子を組み込んだバチルス・ブレイビスを培養することにより、新規コラーゲン様タンパク質を培養物中に生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする新規コラーゲン様タンパク質の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規コラーゲン様タンパク質及び該タンパク質のアミノ酸配列をコードする遺伝子並びに該遺伝子を組込んだバチルス・ブレイビス (*Bacillus brevis*) を培養し、培養物中に生成したコラーゲン様タンパク質を採取することを特徴とする新規コラーゲン様タンパク質の製造方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】遺伝子組換え技術の発展により、多くのタンパク質は細菌、真菌、ほ乳類をはじめとする多様な発現系により遺伝子工学的に発現されるようになってきた。しかしながら、異種タンパク質、特にアミノ酸の繰り返し配列を有するタンパク質(ペプチド)の発現に関して細菌を宿主細胞として使用すると、多くの場合問題が発生する。

【0003】例えば、大腸菌または他の細菌宿主の系を用いた場合、生産された異種タンパク質は菌体内に蓄積され、多くの場合細胞封入体を形成する。封入体を形成した異種タンパク質は、その存在状態故に生物学的あるいは生化学的に不活性であるため、活性型のタンパク質

を得るためには、可溶化、再生の操作がさらに必要となる。すなわち、可溶化、再生の操作が成功しない場合、活性型のタンパク質はほとんど得られない。しかしながら可溶化、再生の条件、操作は未だ確立されておらず、技術的に困難な場合が多い。

【0004】さらに、異種タンパク質が封入体を形成しない場合であっても、菌体内に生産、蓄積された異種タンパク質は、菌体からの抽出およびその抽出液からの精製に多大の時間と労力を要するだけでなく、目的とするタンパク質を完全な形で純粋に得ることが容易ではない。またアミノ酸の繰り返し構造を有するタンパク質においては、大腸菌のように一般的に菌体内にタンパク質を生産する菌では生産効率が悪く、100mg/l以上の生産量を達成することが困難な場合が多い。

【0005】一方、バチルス属に属する微生物は、古くから種々の菌体外酵素の生産菌として工業的に利用されている。これらの菌体外酵素の内、バチルス・アミロリクイファシエンズの $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子[I. Palva et. al, Gene, 22, 229 (1983)]、バチルス・リカニフォルミスのペニシリナーゼ遺伝子や枯草菌の $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子等が既にクローン化され、これらのプロモーターおよびシグナルペプチドを利用した異種タンパク質の菌体外分泌生産系が報告されている。この菌体外分泌生産系では、上記の菌体内生産系で問題となる封入体形成はほとんど認められず、可溶化状態での異種タンパク質の生産を可能にすると共に、菌体からの抽出操作が不要なため、生産コストを大幅に削減できる。

【0006】しかしながら、分泌生産系により、特にアミノ酸の繰り返し配列を有するタンパク質(ペプチド)を生産する場合、他の不具合を呈することが多い。例えば、アミノ酸の繰り返し配列を有するタンパク質では同じ配列の遺伝子が並ぶために相同組換えが起こり異種タンパク質の高レベル分泌生産を困難にすることが知られている。

【0007】これらの点において、当業界で現在使用されている組換え発現系による、アミノ酸の繰り返し配列を有するタンパク質の生産技術は満足のものではなく、研究、診断、治療および工業材料適用における使用を目的とするアミノ酸の繰り返し配列を有するタンパク質の製造および精製に関する生産方法が依然として要望されている。

## 【0008】

【発明が解決しようとする課題】上記のようにアミノ酸の繰り返し配列を有するタンパク質の発現系においては、封入体の形成、相同組換え等の問題で、現在報告されているいずれの生産系も満足できるものとはいえない。本発明は新規コラーゲン様タンパク質(アミノ酸の繰り返し配列を有するタンパク質)及び該タンパク質のアミノ酸配列をコードする遺伝子並びに該遺伝子を組み込んだバチルス・ブレイビス (*Bacillus bre*

10

20

30

40

50

vis)を培養し、培養物中に生成した該コラーゲン様タンパク質を採取する方法を提供するものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、組換え発現系において安定的に異種タンパク質を培地中に発現できる組換え分泌発現系の開発を行ってきた。特に、分泌効率が低いアミノ酸の繰り返し配列を有するタンパク質を効率的に分泌発現できる組換え発現系を作出すべく研究を重ねたところ、アミノ酸の繰り返し配列を有するタンパク質をコードする遺伝子をアミノ酸が変異しない範囲でDNAに変異を加えることにより、目的異種タンパク質を効率的に分泌生産できることを見出した。さらにプロモーター活性の弱い発現ベクターを用いることによりさらに効率的な発現が可能であることを見出した。

【0010】したがって、前記課題はアミノ酸の繰り返し配列を有するタンパク質（ペプチド）をコードするDNAにおいて、アミノ酸が変異を生じない範囲でアミノ酸をコードするコドンに変異を与えた組換えDNAの使用ならびにプロモーターの変換により解決される。すなわち、本発明によれば、通常限られた量のタンパク質が培地中に蓄積されるある種の宿主細胞において、望ましい立体構造を有する新規コラーゲン様タンパク質を培地中に多量に蓄積させることを可能にするDNA構成、およびそれらを保持する宿主細胞を栄養培地に培養することと特徴とする新規コラーゲン様タンパク質の製造方法が提供される。

【0011】

【発明の実施の形態】この発明によると、ある種の宿主細胞において、安定した可溶性のコラーゲン様タンパク質を培地中に多量に製造することができる。

コラーゲン様タンパク質をコードするDNAの構築方法  
天然のコラーゲンはG1y-X-Y（X、Yは任意のアミノ酸を示すがXの位置にはプロリンがYの位置にはハイドロキシプロリンが存在することが多い）なるアミノ酸配列の繰り返し構造を有する。

【0012】従って本発明においてもこのG1y-X-Yというアミノ酸配列を基本構造としてコラーゲン様タンパク質（ペプチド）を設計している。この様な繰り返しのアミノ酸配列では、その遺伝子において同じ塩基配列が繰り返されることがあり、このことが原因で相同組換えが起こり、目的タンパク質の生産量が著しく少なくなることが考えられる。従って本発明のコラーゲン様タンパク質（ペプチド）のDNA配列はアミノ酸レベルでの変異が起こらない範囲でDNAに変異を与えたものの混合物として合成する。

【0013】少なくとも配列番号1、2、4、9及び17に示す30アミノ酸の中で、繰り返しのアミノ酸配列（G1y-X-Y）をコードするDNAの塩基配列がそれぞれ全く同一にならないようにDNAをあらかじめデザインしておく。本発明のコラーゲン様タンパク質のD

NAの塩基配列の構築は、当業界における一般的な遺伝子工学技術を使用する【サンプブック等、「モレキュラー・クローニング、ア・ラボラトリー・マニュアル」、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク（1988）参照】。

【0014】対象タンパク質

この発明は特定のアミノ酸を有するコラーゲン様タンパク質に限定されるわけではなく、多様なアミノ酸配列のコラーゲン様タンパク質を含むものである。この発明の組成物および方法は組換え分泌生産系において非常に少量しか発現されないコラーゲン様タンパク質に特に有用であって、コラーゲン様タンパク質はいずれかの発現系において治療、診断、研究または工業材料に適用されるあらゆるタンパク質を含むうる。

【0015】コラーゲン様タンパク質としては、配列番号1、2、4、9及び17に示す30アミノ酸からなるユニットが1〜30個連結されたものなどが挙げられるが、配列番号1、2、4、9及び17に示す30アミノ酸からなるユニットが5〜8個連結されたものがより好ましい。この30アミノ酸からなるユニットは同じ配列のユニットを連結しても良いし、異なる配列のユニットを連結しても良い。

【0016】また、本発明はその他繰り返しのアミノ酸配列を有するタンパク質、例えばエラスチン、絹、蜘蛛糸等あるいはこれらの一部を変換若しくは他の化合物若しくはタンパク質（ペプチド）で修飾したタンパク質にも適用可能であり、これらのタンパク質も本発明によりバチルス・プレビス菌による発現系により効率的に分泌生産される。この発明を説明している実施例には、本発明の対象タンパク質としてコラーゲン（ゼラチン）が例示されている。これらのタンパク質をバチルス・プレビス以外の細菌を宿主とする生産系で発現すると、発現量が著しく少ないか、発現されても不活性化してしまう。

【0017】発現ベクター

上記のような目的異種タンパク質をコードするDNA分子は、この発明による異種タンパク質発現のための他の配列を伴いうる。すなわち、この発明による望ましいDNA配列は、所望の宿主細胞におけるタンパク質の発現を指図しうる発現制御配列が随伴し、その制御下にある上記融合配列を含む。例えば宿主細胞がバチルス・プレビス株である場合、DNA分子はバチルス・プレビスで機能するプロモーター、リボソーム結合部位を含み、また融合タンパク質の分泌を指図する分泌シグナル配列を有する。

【0018】また所望により、選択可能なマーカー遺伝子を含んでもよく、さらにDNA分子が宿主細胞内において染色体外に存在する場合、複製開始点を含んでもよい。バチルス・プレビス株で機能する具体的な前記配列

は特高らにより公知である(蛋白質核酸酵素, 37, 258-268(1992))。細菌での発現に関してそれに使用される発現ベクターも公知にされているほか、当業界では前記の成分を含む多くの細菌用発現ベクターが知られており、標準的な分子生物学技術により容易に構築されうる。DNA分子は、当業界で通常行われるとおり選択した宿主細胞での発現を最適化するようにコードの選択が修飾されうる。

#### 【0019】宿主

本発明に適した宿主細胞は、好ましくは細菌細胞である。当業界において分泌発現宿主細胞としてよく知られているバチルス・プレビスは特高らにより公知であるほか、下記実施例で使用されるバチルス・プレビス31-OK株は工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-13274として寄託されている。またバチルス・サチルスをはじめとするバチルス属やシュードモナス属等の様々な株もこの発明において使用されうる。

【0020】本発明によりコラーゲン様タンパク質のようにGly-X-Y(X, Yは任意のアミノ酸を示すがXの位置にはプロリンがYの位置にはヒドロキシプロリンが存在することが多い)なるアミノ酸配列の繰り返し構造を有し、例えば30個のアミノ酸からなるユニットが1~30個、より好ましくは5~8個連結したような構造を有する人工的にデザインしたタンパク質の大量分泌発現が可能となった。また、目的タンパク質のアミノ酸配列を変えないようにユニット内のDNAの塩基配列を変換することによりDNAの相同組換えなど従来技術の不具合を回避できることができる。以下に人工的にデザインしたコラーゲン様タンパク質(ゼラチン)の生産に関する実施例を示す。同様の手法を用いることによって絹、エラスチン、蜘蛛糸などの繰り返し配列をもったタンパク質の大量生産が可能である。

#### 【0021】

【実施例】実施例1. 人工コラーゲン(ゼラチン)をコードするDNAのデザイン

(1) 中性ゼラチンをコードするDNAのデザイン  
ヒトI型コラーゲンの部分アミノ酸配列を基に、ヒトI型コラーゲンの平均親水性度を示す30アミノ酸からなる中性ゼラチンのモノマーユニットアミノ酸配列を設計した。

【0022】そのアミノ酸配列をコードする塩基配列の中に後でマルチマー化が可能となるように互いに相補的な付着末端を有するBglII及びBamHIサイトを有するように、また正しい方向でゼラチンユニットが連結できるようにBanIIサイトを配した。またN末端側にはバチルス・プレビスの分泌シグナルに連結できるようにNcoIサイトを、C末端側にはHindIIIサイトを配した。ここで設計したDNAの塩基配列を配列番号8に示す(図1)。またこの中性ゼラチンのモノマーユニットのアミノ酸配列を配列番号9に示す。

【0023】(2) 親水性ゼラチンをコードするDNAのデザイン

(1)と同様に、ヒトI型コラーゲン部分アミノ酸を基に、ヒトI型コラーゲンの最高親水性度を示す30アミノ酸からなる親水性ゼラチンのモノマーユニットアミノ酸配列を設計した。そのアミノ酸配列をコードする塩基配列の中に後にマルチマー化が可能となるように互いに相補的な付着末端を有するBspEI、XmaIサイトを有するように、また正しい方向でゼラチンユニットが連結できるようにBanIIサイトを配した。また、N末端側にはバチルス・プレビスの分泌シグナルに連結できるようにNcoIサイトを、C末端側にはBamHIサイトを配した。ここで設計したDNAの塩基配列は配列番号10に示す。またこの親水性ゼラチンのモノマーユニットのアミノ酸配列を配列番号4に示す。

実施例2. 人工ゼラチンをコードするDNAの大腸菌用プラスミドへの導入及びマルチマー化

(1) 中性ゼラチンをコードするDNAの大腸菌用プラスミドへの導入及びマルチマー化(図1)

バチルス・プレビスの分泌シグナル配列とその後に続くマルチクロニングサイトを含むDNA配列をDNAシンセサイザーにより合成し、配列番号11及び12に示すDNAを得た。これらのDNAをアニール後、HpaIとHindIIIで切断し、プラスミドpBR322(宝酒造(株)製)のNruIとHindIIIサイトに挿入し、大腸菌用のプラスミドpAN3を得た。

【0024】実施例1(1)でデザインした配列番号8とその相補鎖のDNAをDNAシンセサイザーにより合成し、アニール後、先に得たプラスミドpAN3のNcoI、HindIIIサイトに導入してマルチマー化用のベクターB8とした。次に、配列番号13、14、15、16の塩基配列で示されるDNAを合成し、13と14及び15と16をそれぞれアニール後BanIIで切断し、先に構築したマルチマー化用ベクターのBanIIサイトに挿入した。この操作されるゼラチンのモノマーユニットのアミノ酸配列を配列番号17に示す。

【0025】この結果、ゼラチンのモノマーユニットを3個保有するプラスミドpAN3-1及び5個保有するプラスミドpAN3-2が得られた。ここで得たpAN3-2をBglII、HindIIIで切断したlarge fragmentと、pAN3-1をBamHI、HindIIIで切断したsmall fragmentを回収し、DNA ligaseで結合し、ゼラチンのモノマーユニットを8個保有するプラスミドpAN3-B8を得た。このゼラチンのモノマーユニットの8個の連結体の塩基配列は配列番号6に示した。

【0026】(2) 親水性ゼラチンをコードするDNAの大腸菌用プラスミドへの導入及びマルチマー化(図2)

50 実施例1(2)でデザインした配列番号10とその相補

鎖のDNAをDNAシンセサイザーにより合成し、アニール後、(1)で調製した大腸菌用のプラスミドであるpAN3のNcoI、BamHIサイトに導入してマルチマー化用のベクターP6とした。

【0027】次に、配列番号18のアミノ酸をコードするDNA配列をアミノ酸が変異しない範囲でコドンのサードレターを中心に変異を与え、制限酵素切断部位に関係ない位置のグリシンは、GGT、GGC、GGA及びGGGの混合物として合成した。合成したDNA配列を配列番号19に示す。この混合物を鋳型として配列番号20及び21のプライマーDNAを用いてPCRを行った。このプライマーは、マルチマー化用のベクターに連結できるようにN末端側、C末端側にそれぞれBanIIサイトを配した。このPCR産物をBanIIで切断し、先に構築したマルチマー化用ベクターのBanIIサイトに挿入した。

【0028】その結果、ゼラチンのモノマーユニットを3個保有するプラスミドが2つ得られた(pAN3-3、pAN3-4)。pAN3-3をXmaI、BamHIで切断したlarge fragmentと、pAN3-4をBspEI、BamHIで切断したsmall fragmentを回収し、DNA ligaseで結合し、ゼラチンのモノマーユニットを6個保有するプラスミドpAN3-P6を得た。このゼラチンのモノマーユニットの6個の連結体の塩基配列は配列番号7に示した。

#### 【0029】実施例3. プレビス菌による人工ゼラチンの分泌発現

(1) 中性ゼラチンのプレビス菌による分泌発現

① プラスミドpNU212-B8、pNH300Nc-B8の構築

プラスミドpNU210(山形秀夫ら、蛋白質核酸酵素、37、258-268(1992))10ngを鋳型DNAとし、配列番号22及び23で示されるプライマーDNAを用いてPCRを行った。得られたPCR産物をT4ポリメラーゼで処理して末端を平滑化し、Takara DNAライゲーションキット(宝酒造(株)製)でセルフライゲーションを行ってプラスミドpNU212を得た。

【0030】一方、実施例2(1)で調製した中性ゼラチンのマルチマー化した遺伝子pAN3-B8をNcoIおよびHindIIIで切断した。これを、先に得たエリスロマイシン耐性遺伝子を有するpNU212のNcoI、HindIIIサイトに導入し疎水性ゼラチン遺伝子ユニットが8個入ったプラスミドpNU212-B8を得た。

【0031】また、プラスミドpNU210を鋳型DNAとし、このプラスミドに存在するバチルス・プレビスの細胞壁タンパク質(MWP)の遺伝子【山形ら、J. Bacteriol., 169, 1239-1245(1987)】のプロモーターの

一部、MWPのシグナル配列及びマルチクローニングサイトが増幅されるように、配列番号24及び25で示されるプライマーDNAを合成し、PCRを行った。得られたPCR反応液を制限酵素SmaIとEcoRIで消化した。

【0032】一方、プラスミドpUB110(宝酒造(株)製)をEcoRI制限酵素とPvuIIで消化し、この消化物と前記制限酵素SmaIとEcoRI消化物を混合し、Takara DNAライゲーションキット(宝酒造(株)製)でライゲーション反応を行ってプラスミドpNH300を得た。

【0033】次にpNH300を鋳型として、配列番号24及び25で示されるプライマーDNAを用いてPCRを行った。得られたPCR産物をT4ポリメラーゼで処理して末端を平滑化し、Takara DNAライゲーションキット(宝酒造(株)製)でセルフライゲーションを行い、プラスミドpNH300Ncを得た。ここで得たpNH300NcをNcoI、HindIIIで処理し、このDNA断片に実施例2(1)で調製したpAN3-B8のNcoI、HindIII断片を加えてライゲーションを行い中性ゼラチン遺伝子のユニットが8個入ったプラスミドpNH300Nc-B8を得た。

#### 【0034】② 形質転換体の取得

形質転換は、高木らのエレクトロポレーション法(Aqric, Biol. Chem., 53, 3099-3100(1989))により行った。DNAリガーゼで結合させた発現ベクターpNU212-B8およびpNH300Nc-B8を約500ng用いてバチルス・プレビス31-OK株を形質転換し、各々形質転換体を得た(バチルス・プレビス31-OK/pNU212-B8、バチルス・プレビス31-OK/pNH300Nc-B8)。

#### 【0035】③ 中性人工ゼラチンの発現

②で得られた形質転換体各々をYC培地[30gポリペプトンP1(日本製薬)、2g酵母エキス、30gグルコース、0.1g CaCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>O、0.1g MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O、10mg FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O、0.10mg MnSO<sub>4</sub>・4H<sub>2</sub>O、1mg ZnSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O/1; pH7.2]で30℃、6日間培養した。培養上清10μlを用いてその中のタンパク質をSDS-PAGE(12%)により分離し、ウェスタンブロットの手法を用いてニトロセルロース膜上に固定した。

【0036】免疫染色に用いた抗人工ゼラチンペプチド抗体(1次抗体)は化学合成した中性人工ゼラチンの約30個のペプチドをKLH等に化学的に結合させたものをラビットに免疫して得たものを用いた。ブロットしたニトロセルロースフィルターを第一抗体と反応させた後、第二抗体としてアルカリフォスファターゼ標識抗ラビットIgG抗体を用いて、BCIP/NBT(バイオラッド染色キット)を用いて検出した。

【0037】その結果、バチルス・プレビス31-OK/pNU212-B8の中性人工ゼラチンの発現量は10mq/l程度であった。一方、バチルス・プレビス31-OK/pNH300-NcB8の中性人工ゼラチンの発現量は大幅に上昇し数百mq/lであった(図3)。このようにpNH300Ncを用いることによって、大幅に発現量が上昇し、かつ、安定に発現することが可能になった。

【0038】(2) 親水性ゼラチンのプレビス苗による分泌発現

① プラスミドpNH300Nc-P6の構築

(1) ①と同様の方法で実施例2(2)で調製した親水性ゼラチンのマルチマー化した遺伝子pAN3-P6をプラスミドpNH300Ncに組み込んで、親水性ゼラチン遺伝子のユニットが6個入ったプラスミドpNH300Nc-P6を得た。

【0039】② 形質転換体の取得

(1) ②と同様の方法で①で得たプラスミドpNH300Nc-P6でバチルス・プレビス31-OK株を形質転換し、形質転換体バチルス・プレビス31-OK/pNH300Nc-P6を得た。

③ 親水性人工ゼラチンの発現

②で得られた形質転換体をYC培地で30℃、6日間培養し、培養上清を(1)③と同様の方法でウエスタンブロットを行って、発現量を測定した。親水性人工ゼラチンの発現量は、数百mqであった。

#### 実施例4. 人工ゼラチンの精製と構造解析

(1) 発現させたゼラチンの精製

実施例3(1)で調製した疎水性人工ゼラチン発現ベクターを有するプレビス苗(バチルス・プレビス31-OK/pNH300-NcB8)を30℃、6日間、YC培地中で培養し、人工ゼラチンを分泌生産させた。培養液を6000rpm、10分間遠心して培養上清を回収した。この培養上清に30%飽和となるように硫酸を溶解し、室温で30分間攪拌して上清を回収した。更にこの\*

配列

Gly Xa1 Xa2 Gly Xa3 Xa4 Gly Xa5 Xa6 Gly Xa7 Xa8 Gly Xa9 Xa10 Gly  
1 5 10 15  
Xa11 Xa12 Gly Xa13 Xa14 Gly Xa15 Xa16 Gly Xa17 Xa18 Gly Xa19 Xa20  
20 25 30

【0043】配列番号: 2

配列の長さ: 30

配列の型: アミノ酸

トロポジー: 直鎖状

配列

Gly Pro Ala Gly Xa1 Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly  
1 5 10 15  
Pro Val Gly Pro Ala Gly Lys Ser Gly Asp Xa2 Gly Glu Thr  
20 25 30

【0044】配列番号: 3

\* 上清に45%飽和となるように硫酸を溶解して、室温で30分間攪拌した後、遠心により沈殿を回収した。得られた沈殿成分を蒸留水に溶解し、この溶液を1000倍量の蒸留水に対して、4℃、一晚透析して、硫酸30-45%飽和成分を得た。

【0040】さらに、この成分に含まれる人工ゼラチンを陰イオン交換クロマトにより精製した。硫酸30-45%飽和成分に含まれる人工ゼラチンを陰イオン交換カラム(MonoQ5/5, ファルマシア)に吸着させた後、塩化ナトリウムにより溶出した。人工ゼラチンが含まれる溶出成分は、免疫染色により同定した。以上の方法により人工ゼラチンはSDS-PAGE上で単一バンドに精製された(図4)。精製された人工ゼラチンは、陰イオンクロマト溶出液を1000倍量の蒸留水に透析後、凍結乾燥により粉末化した。

【0041】(2) 人工ゼラチンの構造解析

上記実施例で得られた人工ゼラチンと比較例として市販の天然ゼラチン(新田ゼラチン製)の0.03%水溶液を調製した。両者について、230~185nmの波長領域に於ける円偏光二色性スペクトル(日本分光製; CD-720)を比較した(図5)。上記実施例で得られた人工ゼラチンは、天然ゼラチンとほぼ同じCDスペクトルを示し、人工ゼラチンが天然ゼラチンと同様な構造特性を有することが確認された。

【0042】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 30

配列の型: アミノ酸

トロポジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴

Xa1 ~Xa20はヒドロキシプロリンを含む任意のアミノ酸

\* 配列の種類: ペプチド

配列の特徴

Xa1 はAsp またはPro, Xa2はLeu またはArg

※

50 配列の長さ: 231

(7)

特開平11-178574

11

12

配列の型：アミノ酸

\* 配列の種類：タンパク質

トロポジー：直鎖状

\*

配列

Gly Pro Ala Gly Asp Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Pro Val Gly Pro Ala Gly Lys Ser Gly Asp Arg Gly Glu Thr Gly Pro  
 20 25 30  
 Ala Gly Pro Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Pro Val  
 35 40 45  
 Gly Pro Ala Gly Lys Ser Gly Asp Arg Gly Glu Thr Gly Pro Ala Gly  
 50 55 60  
 Pro Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Pro Val Gly Pro  
 65 70 75 80  
 Ala Gly Lys Ser Gly Asp Arg Gly Glu Thr Gly Pro Ala Gly Pro Pro  
 85 90 95  
 Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Pro Val Gly Pro Ala Gly  
 100 105 110  
 Lys Ser Gly Asp Arg Gly Glu Thr Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Ala  
 115 120 125  
 Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Pro Val Gly Pro Ala Gly Lys Ser  
 130 135 140  
 Gly Asp Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Pro Val Gly  
 145 150 155 160  
 Pro Ala Gly Lys Ser Gly Asp Arg Gly Glu Thr Gly Pro Ala Gly Pro  
 165 170 175  
 Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Pro Val Gly Pro Ala  
 180 185 190  
 Gly Lys Ser Gly Asp Arg Gly Glu Thr Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly  
 195 200 205  
 Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Pro Val Gly Pro Ala Gly Lys  
 210 215 220  
 Ser Gly Asp Leu Gly Glu Thr  
 225 230

【0045】配列番号：4

※トロポジー：直鎖状

配列の長さ：30

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

※

配列

Gly Glu Ser Gly Arg Glu Gly Ala Pro Gly Ala Glu Gly Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Arg Asp Gly Ser Pro Gly Ala Lys Gly Asp Arg Gly Glu Thr  
 20 25 30

【0046】配列番号：5

★トロポジー：直鎖状

配列の長さ：168

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

★

配列

Gly Glu Ser Gly Arg Glu Gly Ala Pro Gly Ala Glu Gly Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Arg Asp Gly Ser Pro Gly Ala Lys Gly Asp Arg Gly Glu Thr Gly Glu  
 20 25 30



13 14  
 Ser Gly Arg Glu Gly Ala Pro Gly Ala Glu Gly Ser Pro Gly Arg Asp  
 35 40 45  
 Gly Ser Pro Gly Ala Lys Gly Asp Arg Gly Glu Thr Gly Glu Ser Gly  
 50 55 60  
 Arg Glu Gly Ala Pro Gly Ala Glu Gly Ser Pro Gly Arg Asp Gly Ser  
 65 70 75 80  
 Pro Gly Arg Glu Gly Ala Pro Gly Ala Glu Gly Ser Pro Gly Arg Asp  
 85 90 95  
 Gly Ser Pro Gly Ala Lys Gly Asp Arg Gly Glu Thr Gly Glu Ser Gly  
 100 105 110  
 Arg Glu Gly Ala Pro Gly Ala Glu Gly Ser Pro Gly Arg Asp Gly Ser  
 115 120 125  
 Pro Gly Ala Lys Gly Asp Arg Gly Glu Thr Gly Glu Ser Gly Arg Glu  
 130 135 140  
 Gly Ala Pro Gly Ala Glu Gly Ser Pro Gly Arg Asp Gly Ser Pro Gly  
 145 150 155 160  
 Ala Lys Gly Asp Arg Gly Glu Thr  
 165

【0047】配列番号：6

配列の長さ：693

配列の型：核酸

※トロボシー：一本鎖

20 配列の相類：他の核酸 合成DNA

\*

配列

GGTCTGCTG GCGATCTGG AGCCCCGGT GCACGAGCG CAGCTGGACC AGTCGGCCG 60  
 GCAGTAAAT CAGGTGATCG CCGAGAGACA GGTCTGCTG GCGCGCTGG AGCCCCGGT 120  
 GCACGAGCG CAGCTGGACC AGTCGGCCG GCAGTAAAT CAGGTGATCG CCGAGAGACA 180  
 GGTCTGCTG GCGCGCTGG AGCCCCAGC GCGCGCGGG CCGCGGACC AGTCGGCCG 240  
 GCAGTAAAT CCGGGACCG CCGAGAAACA GGTCCGCTG GACCGCTGG AGCCCCAGC 300  
 GCGCGCGGG CCGCGGACC AGTCGGCCG GCAGTAAAT CCGGGACCG CCGAGAAACA 360  
 GGTCCGCTG GACCGCTGG AGCCCCAGT GCACCTGGG CTCAGGTCC AGTTGGTCA 420  
 GCAGTAAAT CTGGAGATCC TGGAGCCCC GCGCGCGGG GCGCGCGGG ACCAGTCGG 480  
 CCGGAGGTA AATCGGGGA CCGCGAGAA ACAGTCCCG CTGACGCC TGGAGCGCG 540  
 GGTGACCCAG CCGCAGCTG ACCAGTCGG CCGGAGGTA AATCAGGTGA TCGCGGAGAG 600  
 ACAGTCTCTG CTGGCGGCC TGGAGCCCC GGTGCACCTG GCGCTCCAG TCCAGTTGT 660  
 CCAGCAGGTA AATCTGGAGA TCTTGGTGAA ACT 693

【0048】配列番号：7

配列の長さ：504

配列の型：核酸

※トロボシー：一本鎖

配列の相類：他の核酸 合成DNA

※

配列

GTGAATCCG GACGTGAAG AGCCCCCGC GCAGAGGTT CCGCGGTCG GATGGATCA 60  
 CCAGGAGCGA AGCGGATCG CGGTGAAAG GGAGATCAG GCGGAGAAG AGCCCCGGT 120  
 GCGGAGGTT CACCGGTCG AGATGGTGG CCAGGAGCGA AGGAGATCG AGCGGAGACA 180  
 GTGAGTCTG GCGTGAGCG AGCCCCAGT GCAGAGGAT CTCAGGCGG TGATGGTTCT 240  
 CCGGAGCTG AAGGAGCCCC CCGCGGGAG GGTTCGCGG GTGCGGACCG CTCTCCAGGA 300  
 GCGAAGCGG AGCGAGCGA GACTGGTGAA TCTGCGCGT ACGGAGCCCC TGGTCTGAG 360  
 GGTTCGCGG CCGGTGACCG TTGCGCAGGA CCGAAGGAG ATCGCGCGA AACAGGAG 420  
 TCGGTGCGG AGGAGCCCC AGGTGAGAG GATCTCCAG GCGTGATCG TTCTCGCGG 480  
 GCGAAGGCG ATCGTGCTGA AACC 504

【0049】配列番号：8

配列の長さ：119

配列の型：核酸

トロボシー：一本鎖

配列の相類：他の核酸 合成DNA

15

16

配列

GCATGCTTT CCGAGTCTCT GCTGGGATE CTGAGCCCC AGTGCACCT GCGCTCCAG 60  
 GTCCAGTTGG TCCAGCAGGT AAATCTGGAG ATCTTGGTGA AACTTAAGGT ACCAAGCTT 119

【0050】配列番号：9

※トロポジー：直鎖状

配列の長さ：30

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

\*

配列

Gly Pro Ala Gly Asp Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Pro Val Gly Pro Ala Gly Lys Ser Gly Asp Leu Gly Glu Thr  
 20 25 30

【0051】配列番号：10

※トロポジー：一本鎖

配列の長さ：113

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の型：核酸

\*

配列

GCATGCTTT CCGAGTGAA TCCGAGCTG AAGGAGCCC AGTGCAGAG GCATCTCCAG 60  
 GCGTGATGG TTCTGCGGG GCGAAGGCTG ATCTTGGTGA AACTTAAGGT ACC 113

【0052】配列番号：11

★トロポジー：一本鎖

配列の長さ：108

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の型：核酸

★20

配列

GTTAACAGTG TATTGCTAG TCCACTGGA CTTACTGTTG CTCCATGCC TTTCGCTGA 60  
 GCATCGCTCG ACTCTAGAGG TACCAGATCT CTGAGGAGC TCAAGCTT 108

【0053】配列番号：12

☆トロポジー：一本鎖

配列の長さ：108

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の型：核酸

☆

配列

AAGCTTGAGC TCCTGAGAG ATCTGGTACC TCTAGAGTCG ACGGATGCTG CACCGAAAGC 60  
 CATGGGAGCA ACAGTAAGTG CGAGTGCAC AGCAATACA CTGTTAAC 108

【0054】配列番号：13

30◆トロポジー：一本鎖

配列の長さ：96

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の型：核酸

◆

配列

GAGCCCCGG TGCACAGGC GCAGCTGAC CAGTCCGGC GCGAGGTAAA TCAGTGATC 60  
 GCGGAGAGAC AGGTCTGCT GCGCGGCTG GAGCCC 96

【0055】配列番号：14

※トロポジー：一本鎖

配列の長さ：96

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の型：核酸

\*

配列

GGCTTCAGG CCGGACAGCA GGACTGTCT CTCCGGATC AGCTGATTTA CCTGCGGGC 60  
 GCACTGGTC AGGTGGGCT GGTGACCCG GAGTTC 96

【0056】配列番号：15

※トロポジー：一本鎖

配列の長さ：96

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の型：核酸

\*

配列

GAGCCCCAG CCGGCGGGG CCGGCGGAC CAGTCCGGC GCGAGGTAAA TCAGGTACC 60  
 GCGGAGAAC AGGTGGGCT GGTGACCCG GAGTTC 96

【0057】配列番号：16

トロポジー：一本鎖

配列の長さ：96

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の型：核酸

50

(10)

特開平11-178574

17

18

配列

GGCTGAGG CGGTGAGG GGAAGTTT CTGGGGTC CCGGATTTA CTGCGGGC 69  
GACTGTC CCGCGGGC GCGGGCTG GGGTC 96

【0058】配列番号：17

※トロボジー：直鎖状

配列の長さ：30

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

\*

配列

Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly  
1 5 10 15  
Pro Val Gly Pro Ala Gly Lys Ser Gly Asp Arg Gly Glu Thr  
20 25 30

【0059】配列番号：18

※トロボジー：直鎖状

配列の長さ：30

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

※

配列

Gly Ala Pro Gly Ala Glu Gly Ser Pro Gly Arg Asp Gly Ser Pro Gly  
1 5 10 15  
Ala Lys Gly Asp Arg Gly Glu Thr Gly Glu Ser Gly Arg Glu  
20 25 30

【0060】配列番号：19

20★配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の長さ：115

配列の特徴

配列の型：核酸

NはA, C, GまたはT, YはCまたはT, RはGまたはA

トロボジー：一本鎖

★

配列

GCAGTGAAG GAGCCGNGG NGGAGGGT TCNGGNGG NGGAYGNTC NCCAGGAGG 69  
AAGGNGAYC GNGGNGARAC NGGNGARTON GNGGNGARG GAGCCGAGT GCAGA 115

【0061】配列番号：20

☆トロボジー：一本鎖

配列の長さ：17

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の型：核酸

☆

配列

GCAGTGAAG GAGCCG 17

【0062】配列番号：21

◆トロボジー：一本鎖

配列の長さ：16

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の型：核酸

◆

配列

TCTGACCTG GGGTC 16

【0063】配列番号：22

\*トロボジー：一本鎖

配列の長さ：18

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の型：核酸

\*

配列

TGAGAGAAA AGAAAATC 18

【0064】配列番号：23

※トロボジー：一本鎖

配列の長さ：17

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の型：核酸

※

配列

AGGTCTACT TTCCAC 17

【0065】配列番号：24

★トロボジー：一本鎖

配列の長さ：30

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の型：核酸

★

配列

AAACCCGGGA ATATACTAGA GATTTTAAAC

【0066】配列番号: 25

配列の長さ : 2 ?

配列の型：核酸

**6391**

AAAGAATTCA AGCTTCAGCT CCTCGAG

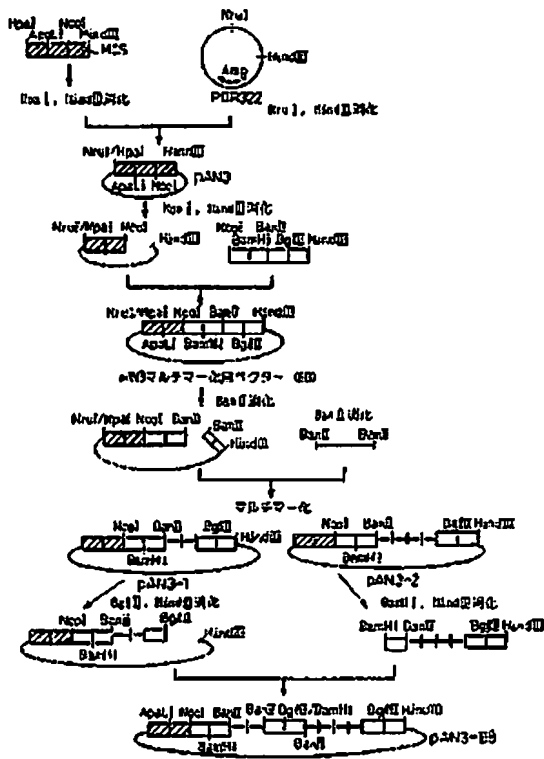
【図面の簡単な説明】  
 図１は、本発明の一実施形態に係る、前記第１の電圧検出部を構成する、第１の電圧検出部１の構成を示すブロック図である。

【図1】図1は中性ゼラチン遺伝子のマルチマー化の原理を示す図である。

【図2】図2は親水性ゼラチン遺伝子のマルチマー化の 10  
原因を示す図である。

【図3】図3はバチルス・ブレビス宿主中で合成遺伝子※

【圖 1】



\* トロポシー：一本鎖

配列の種類：他の核酸 合成DNA

✱

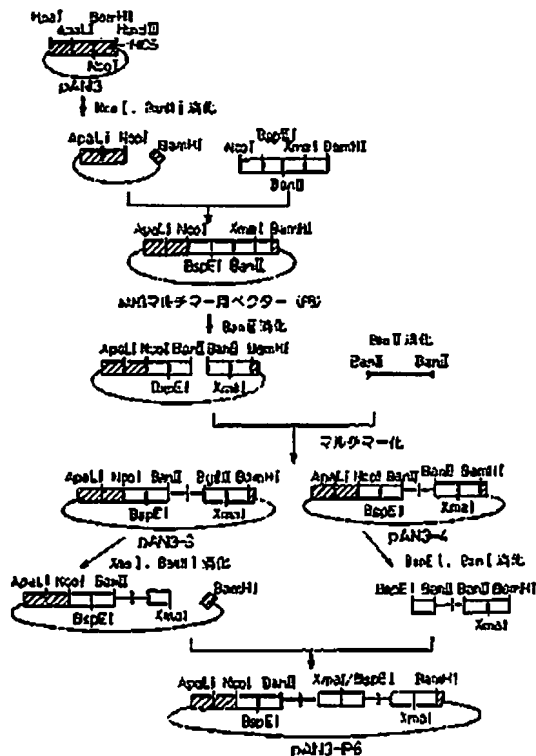
27

※から生産されたタンパク質の電気泳動図である。

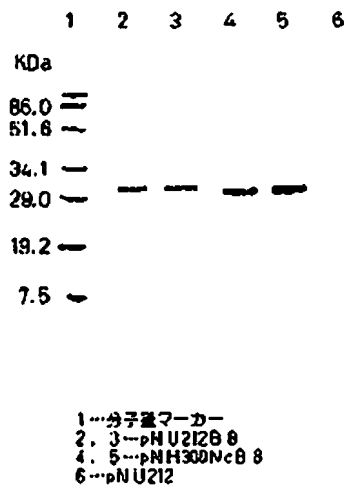
【図4】図4は、バチルス・プレビス宿主中で合成遺伝子から生産されたタンパク質の電気泳動図である。

【図5】図5は本発明の方法により組換え生産された人工ゼラチンタンパク質と天然ゼラチンのCDスペクトルを比較した図である。

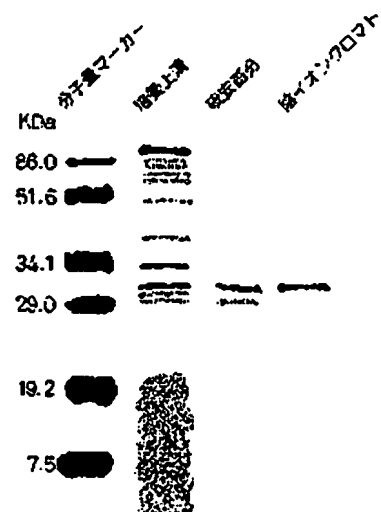
【图2】



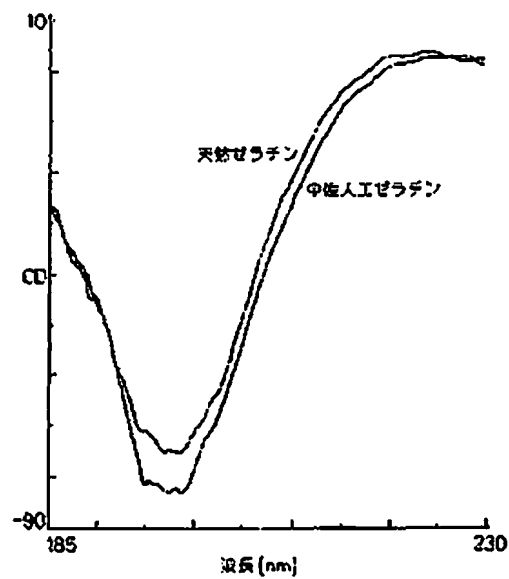
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>°</sup>

識別記号

F I

(C 1 2 N 1/21  
C 1 2 R 1:08)  
(C 1 2 P 21/02  
C 1 2 R 1:08)

(72)発明者 高橋 治雄  
愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番  
地の1 株式会社豊田中央研究所内

(72)発明者 山田 幸生  
愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番  
地の1 株式会社豊田中央研究所内

(72)発明者 平井 正名  
愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番  
地の1 株式会社豊田中央研究所内

(72)発明者 高木 広明  
茨城県鹿島郡波崎町7707-8

(72)発明者 恵比須 省吾  
千葉県鏡子市消水町2798-1

(72)発明者 渡辺 史子  
千葉県鏡子市三軒町8-9